

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/14407 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K 1/00 [DE/DE]; Riedgrasweg 70, 70599 Stuttgart (DE). MAIER, Klaus [DE/DE]; Paracelsusstrasse 79, 70599 Stuttgart (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07763
- (22) Internationales Anmeldedatum: 10. August 2000 (10.08.2000) (74) Anwälte: OTTEN, Hajo usw.; Witte, Weller & Partner, Postfach 105462, 70047 Stuttgart (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) Angaben zur Priorität: 199 39 246.3 19. August 1999 (19.08.1999) DE Veröffentlicht:  
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): M-PHASYS GMBH [DE/DE]; Vor dem Kreuzberg 17, 72070 Tübingen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KIEFER, Hans
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: REFOLDING OF MEMBRANE PROTEINS

(54) Bezeichnung: RÜCKFALTUNG VON MEMBRANPROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing membrane proteins or receptors which are refolded into their native structure. According to said method, solubilized proteins are firstly made available in a first detergent. In order to induce the refolding of the proteins into their native form, the first detergent is replaced by a second detergent. Examples are provided for both the first and second detergents.

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren zur Herstellung von in ihre native Struktur gefalteten Membranproteinen oder Rezeptoren werden zunächst in einem ersten Detergens sozubilisierte Proteine bereitgestellt. Um eine Faltung der Proteine in ihre native Form zu induzieren, wird das erste Detergens gegen ein zweites Detergens ausgetauscht. Sowohl für das erste als auch für das zweite Detergens werden Beispiele angegeben.

### Rückfaltung von Membranproteinen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von in ihre native oder aktive Struktur gefalteten Proteinen aus der Gruppe, die Membranproteine, insbesondere Rezeptoren, vorzugsweise aus der Familie der G-proteingekoppelten Rezeptoren, sowie Teilsequenzen, homologe Sequenzen, mutierte Sequenzen und abgeleitete Sequenzen der Membranproteine und Rezeptoren umfaßt, mit den Schritten:

- Bereitstellen von in einem ersten Detergens solubilisiertem Protein, und
- Austausch des ersten Detergens' gegen ein zweites Detergens, das die Faltung des Proteins in dessen native oder aktive Form induziert.

Für Membranproteine ist ein derartiges Verfahren aus dem Artikel "Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography", Rogl et al. in FEBS Letters 432 (1998) 21-26, bekannt.

Ein Verfahren zur Rückfaltung von Rezeptorprotein ist aus dem Artikel "Expression of an Olfactory Receptor in *Escherichia coli*: Purification, Reconstitution, and Ligand Binding" von Kiefer et al. in Biochemistry 35 (1996) 16077-16084, bekannt.

Den beiden Veröffentlichungen liegt das Problem zugrunde, daß Membranproteine, zu denen auch die Rezeptoren gehören, zwar in großer Menge mit Hilfe von Expressionsvektoren in Bakterien produziert werden können, daß das produzierte Protein jedoch nicht "aktiv" ist. Das Protein wird nämlich nicht in die Membran integriert sondern liegt zunächst im denaturierten Zustand vor und muß durch einen Detergensaustausch in die native oder aktive Struktur (rück)gefaltet werden. Die Aggregate von "inaktivem" Protein werden in der englischsprachigen Literatur als inclusion bodies bezeichnet.

Für die Membranproteine Toc75 und LHCP beschreiben Rogl et al. ein Verfahren, bei dem als erstes Detergens N-Lauroylsarcosin und als zweites Detergens Triton X-100® verwendet wurden. Durch den Austausch des chaotropen durch das milde Detergens ergab sich eine Rückfaltung des aggregierten Proteins.

Gemäß Kiefer et al. wurde ein G-proteingekoppelter Geruchsrezeptor durch Detergensaustausch von N-Lauroylsarcosin in Digitonin während der Bindung an eine Nickelsäule in die aktive Struktur überführt.

In beiden Fällen konnte gezeigt werden, daß das zunächst in Form von inclusion bodies vorliegende aggregierte Protein zunächst in einem denaturierenden Detergens solubilisiert und dann durch den beschriebenen Detergensaustausch in seine aktive Struktur überführt werden konnte, die durch entsprechende Bindungsmessungen verifiziert wurde.

An Membranproteinen, insbesondere an Rezeptoren in nativer oder aktiver Form besteht nicht nur wissenschaftliches sondern auch großes kommerzielles Interesse, denn die Membranproteine sind Bestandteile aller biologischen Membranen und verleihen den verschiedenen zellulären Membranen ihre Spezifität, sind insbesondere für den Stoff- und Reizaustausch verantwortlich.

Die spezifische Erkennung einer chemischen Verbindung durch den zugehörigen Rezeptor hat z.B. zur Folge, daß die Zielzelle ihren physiologischen Zustand ändert. Darum sind Rezeptoren die wichtigsten Zielmoleküle für Medikamente, ca. 3/4 aller im Handel befindlichen Pharmaka wirken auf Rezeptoren, die meisten davon wiederum auf sogenannte G-proteingekoppelte Rezeptoren, die im menschlichen Genom mehrere hundert Vertreter haben.

Für die Entwicklung von spezifischen Antikörpern, von Medikamenten etc. ist es vor diesem Hintergrund sehr wünschenswert, Membranproteine, insbesondere Rezeptoren in aktiver oder nativer Struktur in großen Mengen zur Verfügung zu haben. Da diese Proteine im Gewebe jedoch nur in sehr geringer Konzentration vorkommen, ist es erforderlich, ein System zur rekombinanten Überexpression der Membranproteine und Rezeptoren einzusetzen. Hierzu kann zum einen in eukaryotischen Zellen (Säuger- oder Insektenzellen) funktionelles Protein erzeugt werden, die Sy-

stem sind jedoch teuer, und die Expressionsraten sind niedrig, was ebenfalls von Nachteil ist. Auch bei der bakteriellen Expression kann man funktionelles Protein erhalten, allerdings ist hier die Expressionsrate in der Regel noch niedriger als bei eukaryotischer Expression.

Vor diesem Hintergrund beschreiben die beiden eingangs erwähnten Veröffentlichungen Verfahren, bei denen das Protein im Zellinneren exprimiert wird, wo es jedoch aggregiert, also nicht funktionell vorliegt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß sehr große Mengen an Protein hergestellt werden können, Kiefer et al. berichten, daß bis zu 10 % des Zellproteins und damit 100-10.000 mal mehr Protein als mit anderen Expressionssystemen hergestellt werden kann. Die dabei erzeugten inclusion bodies, über die auch Rogl et al. berichten, müssen dann zunächst solubilisiert und durch den eingangs bereits beschriebenen Detergensaustausch in ihre native oder aktive Struktur überführt werden.

Selbstverständlich richtet sich das kommerzielle Interesse nicht nur auf Membranproteine und Rezeptoren in ihrer natürlich vorkommenden Sequenz, vielmehr sind auch Teilsequenzen, homologe Sequenzen, mutierte Sequenzen oder abgeleitete Sequenzen von Membranproteinen und Rezeptoren Gegenstand dieser Erfindung, denn sie ermöglichen je nach Funktionalität nicht nur Einblicke in die Struktur von Membranproteinen und Rezeptoren, sondern auch ein rationales Medikamentendesign.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die DNA-Sequenz für viele Rezeptoren bekannt ist, derartige Sequenzen sind in der EMBL-Datenbank enthalten. Da diese DNA-Sequenzen meistens keine

Introns enthalten, läßt sich die kodierende Sequenz über PCR aus genomischer DNA oder über RT-PCR aus mRNA herstellen. Diese DNA kann dann in einen entsprechenden Expressionsvektor kloniert werden.

Unbekannt ist jedoch die Struktur des Translationsproduktes, so daß die Bereitstellung von erfindungsgegenständlichen Proteinen in ausreichender Menge Kristallisationsexperimente etc. ermöglicht, um die Struktur weiter aufzuklären.

Es sei noch erwähnt, daß eukaryotisch und bakteriell exprimierte Rezeptoren durch die Glykosylierung unterschieden werden können. G-proteingekoppelte Rezeptoren besitzen nämlich am N-Terminus eine oder mehrere Glykosylierungsstellen, die im endoplasmatischen Retikulum oder später in Golgi-Apparat mit einem Oligosaccharid modifiziert werden. Bakterien modifizieren diese Sequenzen dagegen nicht.

Durch Behandlung eines Teil des Proteins mit N-Glykosidase F oder N-Glykosidase A kann der Saccharidanteil abgespalten werden, so daß auf einem SDS-Gel eine unterschiedliche Lauflänge für Protein vor und nach dieser Behandlung zu erkennen ist, wenn das Protein in eukaryotischen Zellen exprimiert wurde. Bei bakteriell exprimiertem Protein sind keine Lauflängenunterschiede erkennbar.

Obwohl die in den eingangs erwähnten Veröffentlichungen beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Membranprotein bzw. Rezeptorprotein zu aktiven Strukturen führen, sind die beschriebenen Verfahren nach Erkenntnis der Erfinder der hier vorliegenden Anmeldung insofern nicht zufriedenstellend, als

die Ausbeute niedrig und das Verfahren schlecht reproduzierbar ist.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, das eingangs erwähnte Verfahren dahingehend weiterzubilden, daß bei guter Reproduzierbarkeit eine hohe Ausbeute des Proteins in aktiver oder nativer Struktur erreicht wird.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß das zweite Detergens ausgewählt ist aus der Gruppe:

- Alkyl-N,N-dimethylglycin (Alkyl = C8-C16)
- Alkylglykoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigt-kettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide)
- Saccharid-Fettsäureester (bspw. Sucrosemonododecanoat)
- Alkylthioglycoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigt-kettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide mit S- statt O-glycosidischer Bindung)
- Gallensäuren (Cholat, Deoxycholat) und Derivate (bspw. CHAPS, CHAPSO)
- Glucamide (MEGA-8 bis -10, HEGA)
- Lecithine und Lysolecithine (bspw. DHPC, C12-Lysolecithin)
- Alkyl-Phosphorylcholin (Alkyl = C10 - C16).

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben nämlich erkannt, daß die geringe Ausbeute und mangelnde Reproduzierbarkeit bei den bekannten Verfahren auf das zweite Detergens zurückzuführen ist. Überraschenderweise ergeben sich nämlich deutlich höhere Ausbeuten und reproduzierbarere Ergebnisse, wenn das zweite Detergens aus der oben erwähnten Gruppe ausgewählt ist. Dabei ist darauf zu achten, daß das zweite Detergens in seiner Endkonzentration oberhalb der kritischen micellaren Konzentration liegt. Dieser cmc-Wert gibt die Konzentration einer amphiphilen Micellen-bildenden Struktur in Wasser an, oberhalb derer sich Micellen bilden. Der cmc-Wert spiegelt also im Prinzip die Löslichkeit eines Detergens' in Wasser wieder. Oberhalb des cmc-Wertes ist die Konzentration gelöster Detergens-Monomere konstant.

Die cmc-Werte einiger Detergentien sind beschrieben in der Veröffentlichung "Detergents: An Overview" J.M. Neugebauer in Methods in Enzymology 182 (1990), Seiten 239-253.

Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn als zweites Detergens Alkyl-Phosphorylcholin mit einer Kettenlänge von C10-C16 eingesetzt wird. Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben erkannt, daß insbesondere bei G-proteingekoppelten Rezeptoren dieses Detergens für eine hohe Proteinausbeute in rückgefalteter Struktur sorgt.

Gemäß eigener Messungen der Erfinder betragen die cmc-Werte für Alkyl-Phosphorylcholin mit einem Alkylrest von C12, C13, C14 bzw. C16 500, 150, 50 bzw. 5  $\mu\text{M}$ .



Angesichts der Tatsache, daß nur wenige Detergentien überhaupt in der Lage sind, Membranproteine oder gar Rezeptoren stabil in Lösung zu halten, ist es umso überraschender, daß Alkyl-Phosphorylcholin, dessen Verwendung für G-proteingekoppelte Rezeptoren bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde, sogar in der Lage ist, eine Rückfaltung in die native Struktur zu induzieren. Im Falle eines Adenosinrezeptors konnten die Erfinder nachweisen, daß der rückgefaltete Rezeptor native Bindungseigenschaften aufweist, wenn als zweites Detergens Alkyl-Phosphorylcholin eingesetzt wird. Auch für andere Rezeptoren konnte die Rückfaltung mit einem der Detergentien aus der oben genannten Gruppe gezeigt werden.

Dabei ist es bevorzugt, wenn das Protein in Form von inclusion bodies in einer mit einem Expressionsvektor transformierten Zelllinie produziert wird, in den ein für das Protein kodierendes Gen kloniert ist, wobei das Protein vorzugsweise Teil eines Fusionsproteins ist und vor oder nach dem Detergensaustausch von dem Fusionsprotein abgespalten wird.

Die Expression der für das erfindungsgegenständliche Protein kodierenden DNA-Sequenz als Fusionsprotein hat gegenüber der direkten Expression ohne Trägerprotein den Vorteil, daß dieses das gewünschte, jedoch expressionssystemfremde Protein vor Abbau durch Proteasen schützt und zu einem höheren Expressionsniveau führen kann. Insbesondere durch die Verwendung von Glutathion-S-Transferase (GST) als Trägerprotein wird die Löslichkeit von in großen Mengen exprimierten Proteinen in der Wirtszelle erhöht und die Isolierung erleichtert. Das Trägerprotein kann ferner zur Reinigung von Fusionsproteinen benutzt

werden, wenn geeignete Antikörper vorliegen. Gleiches gilt für affinitätschromatographische Reinigungsverfahren.

Dabei ist es weiter bevorzugt, wenn die inclusion bodies aufgereinigt und durch Zusatz des ersten Detergens solubilisiert werden, wobei das erste Detergens ausgewählt ist aus der Gruppe:

N-Lauroylsarcosin, Dodecylsulfat, andere geladene Detergentien oder Harnstoff bzw. Guanidiniumchlorid in Kombination mit geladenen oder ungeladenen Detergentien.

Wichtig ist dabei, daß die Bedingungen, um das Protein in Lösung zu bringen, denaturierend sind, so daß sie die Ausbildung der nativen Struktur nicht ermöglichen.

Dabei ist es insgesamt bevorzugt, wenn das zweite Detergens in einem Faltungspuffer mit gemischten Lipid/Detergensmicellen vorliegt, wobei der Faltungspuffer vorzugsweise das zweite Detergens und Phospholipid aus einer natürlichen Quelle, vorzugsweise einen Lipidextrakt aus Gewebe enthält, in dem das Protein natürlicherweise vorkommt.

Hierbei ist von Vorteil, daß gegenüber der Verwendung von reinen Detergensmicellen die Ausbeute an nativem Protein noch verbessert werden kann. Den Lipidextrakt aus dem Gewebe, in dem der Rezeptor natürlicherweise vorkommt, kann man auch simulieren, indem Lipide mit einer ähnlichen Zusammensetzung verwendet oder gemischt werden.

Bezüglich des Detergensaustausches ist es bevorzugt, wenn dieser durch Dialyse- oder Ultrafiltrationsverfahren, bzw. über chromatographische Verfahren oder durch Verdünnen des solubilierten Proteins in einen das zweite Detergens enthaltenden Puffer erfolgt.

Die insoweit beschriebenen Verfahren zum Detergensaustausch sind untereinander austauschbar und bieten jedes für sich spezifische Vorteile bezüglich der Handhabung, der Verfahrensdauer sowie der erreichbaren Ausbeute.

Nach dem Detergensaustausch muß in dem Protein noch zumindest eine konservierte Disulfidbrücke ausgebildet werden, was vorzugsweise durch Zugabe einer Mischung aus oxidiertem und reduziertem Glutathion erfolgt.

Das gefaltete Protein kann ferner in Proteoliposomen eingebaut werden, die künstlich hergestellte Vesikel sind und eine funktionstüchtige Einheit darstellen. Mit Hilfe dieser gezielt hergestellten Proteoliposomen können bestimmte Prozesse an den Membranproteinen/Rezeptoren gezielt untersucht werden.

Vor diesem Hintergrund betrifft die vorliegende Erfindung ferner Proteoliposomen mit nach dem obigen Verfahren hergestelltem Protein.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Detergens' zur Herstellung von in ihre native oder aktive Struktur gefalteten Proteinen der oben beschriebenen Art, wobei das Detergens ausgewählt ist aus der Gruppe:

- Alkyl-N,N-dimethylglycin (Alkyl = C8-C16)
- Alkylglykoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigt-kettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide)
- Saccharid-Fettsäureester (bspw. Sucrosemonododecanoat)
- Alkylthioglycoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigt-kettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide mit S- statt O-glycosidischer Bindung)
- Gallensäuren (Cholat, Deoxycholat) und Derivate (bspw. CHAPS, CHAPSO)
- Glucamide (MEGA-8 bis -10, HEGA)
- Lecithine und Lysolecithine (bspw. DHPC, C12-Lysolecithin)
- Alkyl-Phosphorylcholin (Alkyl = C10 - C16).

Weitere Vorteile ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung bevorzugter Ausführungsbeispiele.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den jeweils angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Beschreibung einzelner Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1:      Herstellen eines Expressionsvektors mit cDNA  
für Rezeptorprotein

Die DNA-Sequenzen für diverse Rezeptorproteine und auch Membranproteine sind in der EMBL-Datenbank enthalten, sie weisen zumeist keine Introns auf. Mit Hilfe von Primern kann also die erforderliche DNA über PCR aus genomischer DNA oder über RT-PCR aus mRNA hergestellt werden.

Diese DNA wird dann in einen Expressionvektor kloniert, der zur Expression eines Fusionsproteines konstruiert wurde. Das Trägerprotein kann bspw. Glutathion-S-Transferase (GST) sein, wie dies in dem eingangs erwähnten Artikel von Kiefer et al. beschrieben ist, wo ein Fusionsprotein aus dem Rezeptor OR5 und GST erzeugt wurde. Der Expressionsvektor wird in eine Zelllinie transformiert, die das Fusionsprotein exprimiert. Das Protein wird dabei nicht in die Membran eingebaut, sondern liegt zumindest zum Teil aggregiert in Form von inclusion bodies in Zytoplasma vor und ist somit nicht korrekt gefaltet.

Beispiel 2:      Isolierung von exprimiertem Protein

Die cDNA eines der folgenden Rezeptoren wird in-frame in den Vektor pGEX2a-c-His kloniert: AO-Adenosinrezeptors aus dem Hai *Squalus acanthias*, menschlicher beta-2-adrenerger Rezeptor, menschlicher Neuropeptid YY1-Rezeptor, menschlicher Neuropeptid YY2-Rezeptor, menschlicher Melanocortin-1-Rezeptor, menschlicher Oxytocinrezeptor. Dieser Vektor enthält hinter dem Tac-

Promotor die Sequenz, die für Glutathion-S-Transferase und eine darauffolgende Thrombinspaltstelle kodiert, dann eine Polylinkersequenz und schließlich sechs Histidincodons und ein Stopcodon.

Die Vektoren werden in den E. coli-Stamm BL21 transformiert. Die Proteinexpression wird durch Zugabe von IPTG induziert und die Zellen werden nach weiteren drei Stunden geerntet. Nach Lysozymbehandlung und Ultraschallaufschluß werden die Membranen und inclusion bodies durch Zentrifugation von den löslichen Proteinen abgetrennt.

Beispiel 3: Solubilisierung des Proteins und säulenchromatographischer Detergensaustausch

Die inclusion bodies werden durch Zugabe von 1,5 % N-Lauroylsarcosin bei 0°C solubilisiert und mit einem Puffer (0,1 % Alkyl(C14)phosphorylcholin) auf das fünffache Volumen verdünnt. Zu dieser Lösung gibt man Thrombin und inkubiert 16 Stunden bei 20°C, um den Rezeptor von GST abzuspalten. Anschließend werden unlösliche Zellbestandteile abzentrifugiert.

Der Überstand wird auf Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gegeben und eine Stunde lang bei 4°C inkubiert, wobei der Rezeptor an die Nickelmatrix bindet. Danach überführt man das Nickelmaterial in eine Säule und wäscht zum Detergensaustausch mit einem Puffer, der 0,01 % Alkyl(C14)phosphorylcholin als zweites Detergens enthält. Dadurch werden das N-Lauroylsarcosin (erstes Detergens) und kontaminierende Proteine entfernt.

Beispiel 4:      Rekonstitution des Proteins

Zur Rekonstitution löst man eine Lipidmischung, die aus 70 % 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin und 30% 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol besteht, zusammen mit der doppelten (w:w) Menge Dodecylmaltosid in Chloroform und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Darauf gibt man das gereinigte Protein aus Beispiel 3 und inkubiert mindestens eine Stunde lang. Das Detergens wird über eine Polystyrensäule (Calbiosorb von Calbiochem) entfernt, worauf sich Liposomen mit inkorporiertem Rezeptor bilden (Proteoliposomen).

Durch Ligandenbindungsmessungen konnte gezeigt werden, daß der Rezeptor in nativer Struktur vorliegt.

Beispiel 5:      Detergensaustausch mit Lipid/Detergensmicellen

Es werden folgende Stammlösungen angesetzt:

- Cholesterol, Sigma C8667, 100 mg/ml in  $\text{CHCl}_3$ ,
- Schafhirnphospholipid, Sigma P4264, 100 mg/ml in  $\text{CHCl}_3$ ,
- Sojabohnenlecithin, Sigma P3644, 100 mg/ml in  $\text{CHCl}_3$ ,
- 100 mg von Alkyl(C16)-Phosphorylcholin in 50 ml-Flaschen, gelöst in 1-2 ml  $\text{CHCl}_3$ ; Zugabe von 28  $\mu\text{g}$  Cholesterolstammlösung, 32  $\mu\text{l}$  Schafhirnphospholipid-Stammlösung, 40  $\mu\text{l}$  Sojabohnenlecithin-Stammlösung;  $\text{CHCl}_3$  abdampfen und wenigstens 30 Minuten bei weniger als 15 mbar trocknen; Zugabe

von 1 ml Wasser, um eine klare Lösung zu erhalten  
(Detergens-Stammlösung, 100 mg/ml)

- Thrombin, Sigma T4648, 1.000 u/ml in H<sub>2</sub>O, gelagert bei -20°C
- Sarcosyl: 10 % N-Lauroylsarcosin in H<sub>2</sub>O, autoklaviert
- 10 x PBS: 200 mM Natriumphosphat, 1,5 M NaCl, pH 7,0

2 ml 3 % Sarcosyl werden in PBS aufgenommen und auf Eis gelagert. 2 ml inclusion bodies aus Beispiel 2 zugeben und schütteln sowie eine Minute mit Ultraschall behandeln. Unmittelbar danach 16 ml 0,1 % Detergens-Stammlösung in PBS hinzugeben.

Bereits hier erfolgt ein Detergensaustausch, Sarcosyl wird unter den cmc-Wert verdünnt, während die Endkonzentration von Alkyl(C16)phosphorylcholin oberhalb des cmc-Wertes liegt.

Nach Zugabe von 15 u Thrombin wird die Lösung über Nacht bei 20°C gehalten, um das Fusionsprotein zu spalten.

Danach wird die Lösung für 30 Minuten bei 4°C mit 40.000 UPM zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Zu dem Überstand werden 20 mM Imidazol aus einer 1 M-Stammlösung (pH 7,0) hinzugegeben. Diese Lösung wird zu entsprechend aufgereinigtem Säulenmaterial Ni-NTA superflow (Qiagen) hinzugegeben und in einem Kühlraum (4-8°C) für eine Stunde mäßig rotiert, um ein Absetzen des Materials zu verhin-



dern. Auf diese Weise bindet das Rezeptorprotein an das Säulenmaterial.

Danach wird das Säulenmaterial für eine Minute bei 2.000 UPM zentrifugiert und der Überstand soweit entfernt, daß der verbleibende Überstand dem Bettvolumen entspricht. Ni-NTA Agarose wird aufgenommen und in eine Säule gegeben. Mit einer Flußrate von 2 ml/min wird mit 40 ml einer 0,01 % Detergens-Stammlösung in PBS gewaschen, wodurch ein weiterer Detergensaustausch unter Beachtung der cmc-Werte erfolgt.

Die Säule wird dann mit 10 ml von PBS/0,01 % Detergens-Stammlösung/0,3 M Imidazol eluiert und die bei 280 nm absorbierenden Fraktionen gesammelt.

Daraufhin erfolgt für vier Stunden eine Dialyse gegen 2. l PBS bei 4°C, sowie Zugabe von 1 mM GSH/0,1 mM GSSG aus einer 100 x Stammlösung in Wasser.

Die Lösung wird dann für 48 Stunden bei 4°C gelagert, woraufhin durch Flußdialyse die Adenosinbindung nachweisbar war, der Rezeptor lag also in nativer Form vor.

Beispiel 6: Rückfaltung des beta-2-adrenergen Rezeptors durch Detergensaustausch ohne Reinigung des Proteins

Die inclusion bodies mit enthaltenem beta-2-adrenergen Rezeptor aus Beispiel 2 werden durch Zugabe von 1,5% N-Lauroylsarcosin bei 0°C solubilisiert und mit dem 10fachen Volumen einer Lösung von 0,1% Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid in 20mM Na-Malonatpuffer pH 6,0

verdünnt. Anschliessend wird Thrombin (50 Einheiten pro Milligramm Protein) zugegeben und eine Stunde lang bei 20°C inkubiert. Nach Zentrifugation gibt man den Überstand auf einen Lipidfilm wie in Beispiel 4 und rekonstituiert das Protein in Proteoliposomen.

Die erfolgreiche Rückfaltung wird durch Messung der Bindung eines fluoreszierenden Liganden des beta-adrenergen Rezeptors (BODIPY-TMR-CGP 12177 von Molecular Probes) nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von in ihre native oder aktive Struktur gefalteten Proteinen aus der Gruppe, die Membranproteine, insbesondere Rezeptoren, vorzugsweise aus der Familie der G-proteingekoppelten Rezeptoren, sowie Teilssequenzen, homologe Sequenzen, mutierte Sequenzen und abgeleitete Sequenzen der Membranproteine und Rezeptoren umfaßt, mit den Schritten:

- Bereitstellen von in einem ersten Detergens solubilisiertem Protein, und
- Austausch des ersten Detergens' gegen ein zweites Detergens, das eine Faltung des Proteins in dessen native oder aktive Form induziert,

dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Detergens ausgewählt ist aus der Gruppe:

- Alkyl-N,N-dimethylglycin (Alkyl = C8-C16)
- Alkylglykoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigt-kettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide)

- Saccharid-Fettsäureester (bspw. Sucrosemonododecanoat)
  - Alkylthioglycoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigt-kettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide mit S- statt O-glycosidischer Bindung)
  - Gallensäuren (Cholat, Deoxychololat) und Derivate (bspw. CHAPS, CHAPSO)
  - Glucamide (MEGA-8 bis -10, HEGA)
  - Lecithine und Lysolecithine (bspw. DHPC, C12-Lysolecithin)
  - Alkyl-Phosphorylcholin (Alkyl = C10 - C16).
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Detergens in einem Faltungspuffer mit gemischten Lipid/Detergensmicellen vorliegt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Faltungspuffer das zweite Detergens und Phospholipid aus einer natürlichen Quelle, vorzugsweise einen Lipidextrakt aus Gewebe enthält, in dem das Protein natürlicherweise vorkommt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Detergensaustausch durch Dialyse- oder Ultrafiltrationsverfahren erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Detergensaustausch über ein chromatographisches Verfahren erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Detergensaustausch durch Verdünnen des solubilisierten Proteins in einen das zweite Detergens enthaltenden Puffer erfolgt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß nach dem Detergensaustausch in dem Protein zumindest eine konservierte Disulfidbrücke ausgebildet wird, vorzugsweise durch Zugabe einer Mischung aus oxidiertem und reduziertem Glutathion.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das gefaltete Protein in Proteoliposomen eingebaut wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein in Form von inclusion bodies in einer mit einem Expressionsvektor transformierten Zelllinie produziert wird, in den ein für das Protein kodierendes Gen kloniert ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein Teil eines Fusionsproteins

ist und vor oder nach dem Detergensaustausch von dem Fusionsprotein abgespalten wird.

11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die inclusion bodies aufgereinigt und durch Zusatz des ersten Detergens solubilisiert werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das erste Detergens ausgewählt ist aus der Gruppe N-Lauroylsarcosin, Dodecylsulfat, andere geladene Detergentien oder Harnstoff bzw. Guanidiniumchlorid in Kombination mit geladenen oder ungeladenen Detergentien.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Detergens oberhalb der kritischen micellaren Konzentration eingesetzt wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß als zweites Detergens Alkyl-Phosphorylcholin mit einer Kettenlänge von C10-C16 eingesetzt wird.
15. Proteoliposomen mit nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 hergestelltem Protein.
16. Verwendung eines Detergens zur Herstellung von in ihre native oder aktive Struktur gefalteten Proteinen aus der Gruppe, die Membranproteine, insbesondere Rezeptoren, vorzugsweise aus der Familie der G-proteingekoppelten Rezeptoren, sowie Teilsequenzen, homologe Sequenzen, mutierte

Sequenzen und abgeleitete Sequenzen der Membranproteine und Rezeptoren umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß das Detergens ausgewählt ist aus der Gruppe:

- Alkyl-N,N-dimethylglycin (Alkyl = C8-C16)
- Alkylglykoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigtkettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide)
- Saccharid-Fettsäureester (bspw. Sucrosemonododecanoat)
- Alkylthioglycoside (Alkyl = C5-C12, auch verzweigtkettige oder cyclische Alkylreste, glycosid = Alle Mono- und Disaccharide mit S- statt O-glycosidischer Bindung)
- Gallensäuren (Cholat, Deoxycholat) und Derivate (bspw. CHAPS, CHAPSO)
- Glucamide (MEGA-8 bis -10, HEGA)
- Lecithine und Lysolecithine (bspw. DHPC, C12-Lysolecithin)
- Alkyl-Phosphorylcholin (Alkyl = C10 - C16).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/14407 A3**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K 1/113 Klaus [DE/DE]; Paracelsusstrasse 79, 70599 Stuttgart (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07763
- (22) Internationales Anmeldedatum: 10. August 2000 (10.08.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 39 246.3 19. August 1999 (19.08.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): M-PHASYS GMBH [DE/DE]; Vor dem Kreuzberg 17, 72070 Tübingen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KIEFER, Hans [DE/DE]; Riedgrasweg 70, 70599 Stuttgart (DE). MAIER,
- (74) Anwälte: OTTEN, Hajo usw.; Witte, Weller & Partner, Postfach 105462, 70047 Stuttgart (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- Veröffentlicht: — mit internationalem Recherchenbericht
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 20. September 2001
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: REFOLDING OF MEMBRANE PROTEINS, USING TWO DIFFERENT DETERGENTS

(54) Bezeichnung: RÜCKFALTUNG VON MEMBRANPROTEINEN DURCH VERWENDUNG ZWEIFER UNTERSCHIEDLICHEN DETERGENTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing membrane proteins or receptors which are refolded into their native structure. According to said method, solubilized proteins are firstly made available in a first detergent. In order to induce the refolding of the proteins into their native form, the first detergent is replaced by a second detergent. Examples are provided for both the first and second detergents.

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren zur Herstellung von in ihre native Struktur gefalteten Membranproteinen oder Rezeptoren werden zunächst in einem ersten Detergens sozubilisierte Proteine bereitgestellt. Um eine Faltung der Proteine in ihre native Form zu induzieren, wird das erste Detergens gegen ein zweites Detergens ausgetauscht. Sowohl für das erste als auch für das zweite Detergens werden Beispiele angegeben.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In **ational Application No**  
PCT/EP 00/07763

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C07K1/113

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H ROGL ET AL.: "Refolding of Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilized by nickel chelating chromatography" FEBS LETTERS, vol. 432, no. 1, 1998, pages 21-26, XP002130408 AMSTERDAM NL cited in the application the whole document --- -/--	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*S\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 March 2001

Date of mailing of the international search report

28/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No

PCT/EP 00/07763

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H KIEFER ET AL.: "Expression of an olfactory receptor in Escherichia coli: purification, reconstitution and ligand binding" BIOCHEMISTRY., vol. 35, no. 50, 1996, pages 16077-16084, XP002130409 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA., US ISSN: 0006-2960 cited in the application the whole document ---	1-16
X	WO 98 19789 A (CONNAUGHT) 14 May 1998 (1998-05-14) the whole document ---	1-16
X	EP 0 334 278 A (BREDT ET AL.) 27 September 1989 (1989-09-27) claim 1 ---	1-16
X	WO 95 03069 A (NORTH AMERICAN VACCINE INC.) 2 February 1995 (1995-02-02) example 6 ---	1-16
X	DE 30 14 189 A (K SIMONS & A HELENIUS) 15 October 1981 (1981-10-15) the whole document ---	1-16
X	WO 94 00557 A (CNRS) 6 January 1994 (1994-01-06) the whole document ---	1-16
X	S TANDON & P M HOROWITZ: "Detergent assisted refolding of guanidinium chloride-denatured" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 262, no. 10, 1987, pages 4486-4491, XP002089255 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 the whole document ---	16
X	G ZARDENETA & P M HOROWITZ: "Micelle-assisted protein folding" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 267, no. 25, 1992, pages 5811-5816, XP000262801 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 the whole document ---	16
	--- -/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ational Application No

PCT/EP 00/07763

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	EP 0 321 606 A (IMMUNO AG) 28 June 1989 (1989-06-28) the whole document ---	16
O,P, X	H KIEFER ET AL.: "Refolding of G-protein-coupled receptors from inclusion bodies produced in Escherichia coli" BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS., vol. 27, no. 6, December 1999 (1999-12), pages 908-912, XP000991446 COLCHESTER, ESSEX, GB ISSN: 0300-5127 the whole document ---	1-16
O,X	H KIEFER ET AL.: "Refolding of G protein-coupled receptors from inclusion bodies " BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS., vol. 27, July 1999 (1999-07), page A141 XP002162857 COLCHESTER, ESSEX, GB ISSN: 0300-5127 the whole document -----	1-16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In. tional Application No

PCT/EP 00/07763

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9819789	A	14-05-1998	US 6103933 A	15-08-2000
			AU 4662297 A	29-05-1998
			EP 0946283 A	06-10-1999
EP 334278	A	27-09-1989	DE 3809796 A	05-10-1989
			AU 615523 B	03-10-1991
			AU 3158189 A	28-09-1989
			JP 2036193 A	06-02-1990
			US 5084561 A	28-01-1992
WO 9503069	A	02-02-1995	US 6153406 A	28-11-2000
			AU 698458 B	29-10-1998
			AU 7514494 A	20-02-1995
			BR 9407144 A	17-09-1996
			CA 2167808 A	02-02-1995
			EP 0724455 A	07-08-1996
			FI 960308 A	22-03-1996
			JP 9500537 T	21-01-1997
			NO 960255 A	22-03-1996
			NZ 271500 A	24-11-1997
			PL 312700 A	13-05-1996
DE 3014189	A	15-10-1981	EP 0037931 A	21-10-1981
			JP 56161331 A	11-12-1981
			US 4356169 A	26-10-1982
WO 9400557	A	06-01-1994	FR 2692898 A	31-12-1993
			AU 4504793 A	24-01-1994
EP 321606	A	28-06-1989	AT 95188 T	15-10-1993
			DE 3787654 D	04-11-1993
			DK 628188 A	24-06-1989
			FI 885629 A,B,	24-06-1989
			FI 953141 A,B,	22-06-1995
			JP 2000798 A	05-01-1990
			JP 2656098 B	24-09-1997
			NO 175782 B	29-08-1994

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07763

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C07K1/113

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	H ROGL ET AL.: "Refolding of Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilized by nickel chelating chromatography" FEBS LETTERS, Bd. 432, Nr. 1, 1998, Seiten 21-26, XP002130408 AMSTERDAM NL in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- -/--	1-16

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. März 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28/03/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Masturzo, P

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit enordenlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
X	H KIEFER ET AL.: "Expression of an olfactory receptor in Escherichia coli: purification, reconstitution and ligand binding" BIOCHEMISTRY., Bd. 35, Nr. 50, 1996, Seiten 16077-16084, XP002130409 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA., US ISSN: 0006-2960 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	1-16
X	WO 98 19789 A (CONNAUGHT) 14. Mai 1998 (1998-05-14) das ganze Dokument ----	1-16
X	EP 0 334 278 A (BREDT ET AL.) 27. September 1989 (1989-09-27) Anspruch 1 ----	1-16
X	WO 95 03069 A (NORTH AMERICAN VACCINE INC.) 2. Februar 1995 (1995-02-02) Beispiel 6 ----	1-16
X	DE 30 14 189 A (K SIMONS & A HELENIUS) 15. Oktober 1981 (1981-10-15) das ganze Dokument ----	1-16
X	WO 94 00557 A (CNRS) 6. Januar 1994 (1994-01-06) das ganze Dokument ----	1-16
X	S TANDON & P M HOROWITZ: "Detergent assisted refolding of guanidinium chloride-denatured" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., Bd. 262, Nr. 10, 1987, Seiten 4486-4491, XP002089255 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument ----	16
X	G ZARDENETA & P M HOROWITZ: "Micelle-assisted protein folding" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., Bd. 267, Nr. 25, 1992, Seiten 5811-5816, XP000262801 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument ----- -/--	16

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07763

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>2</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 321 606 A (IMMUNO AG) 28. Juni 1989 (1989-06-28) das ganze Dokument ----	16
O,P, X	H KIEFER ET AL.: "Refolding of G-protein-coupled receptors from inclusion bodies produced in Escherichia coli" BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS., Bd. 27, Nr. 6, Dezember 1999 (1999-12), Seiten 908-912, XP000991446 COLCHESTER, ESSEX, GB ISSN: 0300-5127 das ganze Dokument ----	1-16
O,X	H KIEFER ET AL.: "Refolding of G protein-coupled receptors from inclusion bodies " BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS., Bd. 27, Juli 1999 (1999-07), Seite A141 XP002162857 COLCHESTER, ESSEX, GB ISSN: 0300-5127 das ganze Dokument -----	1-16



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In. .tionales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07763

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9819789 A	14-05-1998	US 6103933 A AU 4662297 A EP 0946283 A	15-08-2000 29-05-1998 06-10-1999
EP 334278 A	27-09-1989	DE 3809796 A AU 615523 B AU 3158189 A JP 2036193 A US 5084561 A	05-10-1989 03-10-1991 28-09-1989 06-02-1990 28-01-1992
WO 9503069 A	02-02-1995	US 6153406 A AU 698458 B AU 7514494 A BR 9407144 A CA 2167808 A EP 0724455 A FI 960308 A JP 9500537 T NO 960255 A NZ 271500 A PL 312700 A	28-11-2000 29-10-1998 20-02-1995 17-09-1996 02-02-1995 07-08-1996 22-03-1996 21-01-1997 22-03-1996 24-11-1997 13-05-1996
DE 3014189 A	15-10-1981	EP 0037931 A JP 56161331 A US 4356169 A	21-10-1981 11-12-1981 26-10-1982
WO 9400557 A	06-01-1994	FR 2692898 A AU 4504793 A	31-12-1993 24-01-1994
EP 321606 A	28-06-1989	AT 95188 T DE 3787654 D DK 628188 A FI 885629 A,B, FI 953141 A,B, JP 2000798 A JP 2656098 B NO 175782 B	15-10-1993 04-11-1993 24-06-1989 24-06-1989 22-06-1995 05-01-1990 24-09-1997 29-08-1994

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**